

ANTIBODY-CONTAINING SOLUTION PHARMACEUTICAL

Publication number: JP2004292455 (A)

Publication date: 2004-10-21

Inventor(s): TSUNODA MASAYA; KIKUCHI ATSUSHI; MIZUSHIMA HIDEFUMI; IMAEDA YOSHIMI

Applicant(s): CHUGAI PHARMACEUTICAL CO LTD

Classification:

- international: **A61K9/08; A61K39/395; A61K47/10; A61K47/14; A61K47/26; A61K9/08; A61K39/395; A61K47/10; A61K47/14; A61K47/26;** (IPC1-7): A61K39/395; A61K9/08; A61K47/10; A61K47/14; A61K47/26

- European:

Application number: JP20040119277 20040414

Priority number(s): JP20040119277 20040414; JP20020036244 20020214

Abstract of **JP 2004292455 (A)**

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide an antibody-containing solution pharmaceutical with high survival rate of the antibody, stable for long time storing by suppressing formation of insoluble particles in producing process or storing stage of the antibody-containing solution pharmaceutical and suppressing formation of degradation products. ; SOLUTION: The antibody-containing solution pharmaceutical comprises a saccharide as a stabilizer. The solution pharmaceutical can further comprise a surfactant as another stabilizer. ; COPYRIGHT: (C)2005,JPO&NCIPI

Data supplied from the **esp@cenet** database — Worldwide

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2004-292455

(P2004-292455A)

(43) 公開日 平成16年10月21日 (2004. 10. 21)

(51) Int. CL. ⁷

F 1

テーマコード (参考)

A 6 1 K 39/395

A 6 1 K 39/395

M

4 C 0 7 6

A 6 1 K 9/08

A 6 1 K 39/395

Y

4 C 0 8 5

A 6 1 K 47/10

A 6 1 K 9/08

A 6 1 K 47/14

A 6 1 K 47/10

A 6 1 K 47/26

A 6 1 K 47/14

審査請求 未請求 請求項の数 19 O L (全 25 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2004-119277 (P2004-119277)

(22) 出願日 平成16年4月14日 (2004. 4. 14)

(62) 分割の表示 特願2003-567440 (P2003-567440)
の分割

原出願日 平成15年2月14日 (2003. 2. 14)

(31) 優先権主張番号 特願2002-36244 (P2002-36244)

(32) 優先日 平成14年2月14日 (2002. 2. 14)

(33) 優先権主張国 日本国 (JP)

(71) 出願人 000003311

中外製薬株式会社

東京都北区浮間5丁目5番1号

(74) 代理人 100089705

弁理士 社本 一夫

(74) 代理人 100076691

弁理士 増井 忠式

(74) 代理人 100075270

弁理士 小林 泰

(74) 代理人 100080137

弁理士 千葉 昭男

(74) 代理人 100096013

弁理士 富田 博行

(74) 代理人 100091638

弁理士 江尻 ひろ子

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 抗体含有溶液製剤

(57) 【要約】

【課題】 安定な抗体含有溶液製剤を提供すること。

【解決手段】 安定化剤として糖類を含む抗体含有溶液製剤。この溶液製剤には安定化剤として界面活性剤をさらに含むことができる。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】**【請求項1】**

安定化剤として糖類を含む抗体含有溶液製剤。

【請求項2】

安定化剤として界面活性剤をさらに含む請求項1記載の溶液製剤。

【請求項3】

糖類が、糖アルコール、非還元オリゴ糖類である請求項1または2記載の溶液製剤。

【請求項4】

糖類が、非還元オリゴ糖類である請求項1または2記載の溶液製剤。

【請求項5】

糖類が、マンニトール、スクロース、トレハロース、またはラフィノースである請求項1または2記載の溶液製剤。

【請求項6】

糖がスクロース、トレハロース、またはラフィノースである請求項1または2記載の溶液製剤。

【請求項7】

糖がスクロースまたはトレハロースである請求項1または2記載の溶液製剤。

【請求項8】

糖がスクロースである請求項1または2記載の溶液製剤。

【請求項9】

界面活性剤がポリソルベート80又は20である請求項2～8のいずれかに記載の溶液製剤。

【請求項10】

抗体が、組換え抗体である請求項1～9のいずれかに記載の溶液製剤。

【請求項11】

抗体が、キメラ抗体、ヒト型化抗体またはヒト抗体である請求項10に記載の溶液製剤。

【請求項12】

抗体が、IgGクラスの抗体である請求項1～11のいずれかに記載の溶液製剤。

【請求項13】

IgGクラスの抗体がIgG1クラスの抗体である請求項12に記載の溶液製剤。

【請求項14】

抗体が、抗インターロイキン-6レセプター抗体または抗HM1.24抗体である請求項1～13のいずれかに記載の溶液製剤。

【請求項15】

溶液中に糖類を添加することを含む、抗体含有溶液製剤中の抗体会合体分子の生成を抑制する方法。

【請求項16】

溶液中に非還元オリゴ糖類を添加することを含む、抗体含有溶液の凍結融解時における抗体会合体分子の生成を抑制する方法。

【請求項17】

溶液中に非還元二糖類または非還元三糖類を添加することを含む、抗体含有溶液の凍結融解時における抗体会合体分子の生成を抑制する方法。

【請求項18】

界面活性剤を添加することを含む、抗体含有溶液の凍結融解時における不溶性微粒子の生成を抑制する方法。

【請求項19】

非還元糖類及び界面活性剤を添加することを含む、抗体含有溶液の凍結融解時における抗体の安定化方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】**【0001】**

本発明は安定な抗体含有溶液製剤に関する。

【背景技術】**【0002】**

遺伝子組換え技術の発達によって、免疫グロブリン、モノクローナル抗体、ヒト型化抗体等の抗体を医薬品として利用することが可能となってきた。これらを安定した供給量で提供するためには、抗体の構造及び活性を保持しうる製造条件及び保存条件を確立することが必要とされている。

【0003】

一般に、タンパク質を高濃度溶液にて保存する場合、不溶性凝集体の生成を始めとする劣化現象が問題となり、それを防止する必要がある。特に、抗体製剤では溶液状態では保存時に会合体が生成しやすく、不溶性凝集体が生じるという問題があった。

【0004】

例えば、本出願人は、抗IL-6レセプター抗体が未熟型骨髓腫細胞の治療効果を有することを見いだし（特開平8-99902号）、抗IL-6レセプター抗体として、再構成した（reshaped）ヒト型化抗体であるhPM-1抗体の大量生産に成功し、この精製した抗IL-6レセプター抗体の製剤化を検討してきた。抗IL-6レセプターヒト型化抗体は不安定なタンパク質であり、精製工程において実施するウイルス除去及び除菌のための過剰ストレス、濃縮ストレス、熱ストレス、光ストレスなどによって会合、凝集などの物理的、化学的变化を生じやすい。

【0005】

さらに、遺伝子工学的手法で抗体を得るときには、抗体産生細胞をバルク培養し、精製して得られた抗体含有溶液を凍結して保存し、製剤化の段階で融解する。このような凍結融解を繰り返す過程で抗体二量体や不溶性微粒子が生成したり、また長期保存中に抗体が分解されて分解物が生じ、結果として抗体の残存率が低下することが問題であった。

【0006】

タンパク質を溶液状態にて保存する方法については、これまでに多くの検討がなされており、化学的、物理的变化を抑制するための安定化剤としてヒト血清アルブミンあるいは精製ゼラチンなどのタンパク質といった高分子類或いはポリオール類、アミノ酸及び界面活性剤等といった低分子類を添加することによる安定化効果が見出されている。しかしながら、タンパク質のような生体由来の高分子を安定化剤として添加することは、ウイルスやプリオン等のコンタミを除去するなどのために非常に煩雑な工程を必要とするなどの問題があった。また、低分子類の添加についても、添加する成分はなるべく少ない方が好ましい。

【0007】

抗体の凍結乾燥製剤の安定化については、安定化剤として糖又はアミノ糖、アミノ酸、及び界面活性剤を含有する凍結乾燥製剤が報告されている（特表2001-503781号）。

【0008】

しかし、使用前に溶解再構成する必要がなく、使用勝手のよい溶液製剤に対する需要が大きく、安定な抗体含有溶液製剤が求められていた。

【発明の開示】**【0009】**

本発明の目的は、抗体含有溶液製剤を製造又は保存する過程の不溶性微粒子や会合体の生成を抑制して、さらに分解物の生成を抑制し、抗体の残存率が高い長期保存にも安定な抗体含有溶液製剤を提供することである。

【0010】

上記目的を達成するために鋭意研究した結果、本発明者らは、糖を添加することにより凍結融解段階の二量体生成や、長期保存時の会合体生成、分解物生成を抑制できること、

ならびに界面活性剤を添加することにより凍結融解段階での不溶性微粒子の生成を極めて顕著に抑制できることを発見して本発明を完成した。

【0011】

すなわち、本発明は以下のものを提供する。

- (1) 安定化剤として糖類を含む抗体含有溶液製剤。
- (2) 安定化剤として界面活性剤をさらに含む(1)記載の溶液製剤。
- (3) 糖類が、糖アルコール、非還元オリゴ糖類である(1)または(2)記載の溶液製剤。
- (4) 糖類が、非還元オリゴ糖類である(1)または(2)記載の溶液製剤。
- (5) 糖類が、マンニトール、スクロース、トレハロース、またはラフィノースである(1)または(2)記載の溶液製剤。
- (6) 糖がスクロース、トレハロース、またはラフィノースである(1)または(2)記載の溶液製剤。
- (7) 糖がスクロースまたはトレハロースである(1)または(2)記載の溶液製剤。
- (8) 糖がスクロースである(1)または(2)記載の溶液製剤。
- (9) 界面活性剤がポリソルベート80又は20である(2)～(8)のいずれかに記載の溶液製剤。
- (10) 抗体が、組換え抗体である(1)～(9)のいずれかに記載の溶液製剤。
- (11) 抗体が、キメラ抗体、ヒト型化抗体またはヒト抗体である(10)に記載の溶液製剤。
- (12) 抗体が、IgGクラスの抗体である(1)～(11)のいずれかに記載の溶液製剤。
- (13) IgGクラスの抗体がIgG1クラスの抗体である(12)に記載の溶液製剤。
- (14) 抗体が、抗インターロイキン-6レセプター抗体または抗HM1.24抗体である(1)～(13)のいずれかに記載の溶液製剤。
- (15) 溶液中に糖類を添加することを含む、抗体含有溶液製剤中の抗体会合体分子の生成を抑制する方法。
- (16) 溶液中に非還元オリゴ糖類を添加することを含む、抗体含有溶液の凍結融解時における抗体会合体分子の生成を抑制する方法。
- (17) 溶液中に非還元二糖類または非還元三糖類を添加することを含む、抗体含有溶液の凍結融解時における抗体会合体分子の生成を抑制する方法。
- (18) 界面活性剤を加することを含む、抗体含有溶液の凍結融解時における不溶性微粒子の生成を抑制する方法。
- (19) 非還元糖類及び界面活性剤を添加することを含む、抗体含有溶液の凍結融解時における抗体の安定化方法。

【発明を実施するための最良の形態】

【0012】

本発明において、抗体含有溶液製剤とは、活性成分として抗体を含み、ヒト等の動物に投与できるように調製された溶液製剤を言い、好ましくは製造過程に凍結乾燥工程を含まないで製造された溶液製剤を言う。

【0013】

本発明では、抗体含有溶液とは、生体由来抗体であるか、あるいは組換え抗体であるかを問わず、いかなる抗体を含む溶液であってもよく、好ましくは、培養して得られた抗体を含むCHO細胞などの哺乳動物細胞の培養培地、あるいはこれに部分的精製などの一定の処理を施したもの(バルク溶液)、あるいは上記のヒト等の動物に投与できるように調製された溶液製剤である。

【0014】

本発明において、不溶性微粒子とは、日本薬局方・一般試験法・注射剤の不溶性微粒子試験法に定めるように、10 μ m以上の微粒子性の不溶性異物をいう。不溶性微粒子の測定には顕微鏡、不溶性微粒子捕集用濾過器及び測定用メンブランフィルターを用いるが、

簡便には光遮へい型自動微粒子測定装置によって測定することもできる。

【0015】

本発明において、不溶性異物とは、日本薬局方・一般試験法・注射剤の不溶性異物検査法に定めるように、容器に入れた溶液製剤を白色光源の直下、約1000ルクスの明るさの位置で肉眼で観察するときに、澄明で、たやすく検出される不溶性異物をいう。

【0016】

本発明において、会合体、分解物とはそれぞれ製剤の有効成分である抗体分子の会合体及び分解物をいい、その含量は例えば、後述するゲル濾過クロマトグラフィーによる面積百分率法により求めることができる。

【0017】

本発明の溶液製剤に使用される抗体は、所望の抗原と結合する限り特に制限はなく、マウス抗体、ラット抗体、ウサギ抗体、ヒツジ抗体、キメラ抗体、ヒト型化抗体、ヒト抗体等を適宜用いることができる。抗体は、ポリクローナル抗体であってもモノクローナル抗体であってもよいが、均質な抗体を安定に生産できる点でモノクローナル抗体が好ましい。ポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体は当業者に周知の方法により作製することができる。

【0018】

モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマは、基本的には公知技術を使用し、以下のようにして作製できる。すなわち、所望の抗原や所望の抗原を発現する細胞を感作抗原として使用して、これを通常の免疫方法にしたがって免疫し、得られる免疫細胞を通常の細胞融合法によって公知の親細胞と融合させ、通常のスクリーニング法により、モノクローナルな抗体産生細胞（ハイブリドーマ）をスクリーニングすることによって作製できる。ハイブリドーマの作製は、たとえば、ミルステインらの方法（Kohler, G. and Milstein, C., Methods Enzymol. (1981) 73: 3-46）等に準じて行うことができる。抗原の免疫原性が低い場合には、アルブミン等の免疫原性を有する巨大分子と結合させ、免疫を行えばよい。

【0019】

また、抗体遺伝子をハイブリドーマからクローニングし、適当なベクターに組み込んで、これを宿主に導入し、遺伝子組換え技術を用いて産生させた遺伝子組換え型抗体を用いることができる（例えば、Carl, A. K. Borrebaeck, James, W. Larrick, THERAPEUTIC MONOCLONAL ANTIBODIES, Published in the United Kingdom by MACMILLAN PUBLISHERS LTD, 1990 参照）。具体的には、ハイブリドーマのmRNAから逆転写酵素を用いて抗体の可変領域（V領域）のcDNAを合成する。目的とする抗体のV領域をコードするDNAが得られれば、これを所望の抗体定常領域（C領域）をコードするDNAと連結し、これを発現ベクターへ組み込む。または、抗体のV領域をコードするDNAを、抗体C領域のDNAを含む発現ベクターへ組み込んでもよい。発現制御領域、例えば、エンハンサー、プロモーターの制御のもとで発現するよう発現ベクターに組み込む。次に、この発現ベクターにより宿主細胞を形質転換し、抗体を発現させることができる。

【0020】

本発明では、ヒトに対する異種抗原性を低下させること等を目的として人為的に改変した遺伝子組換え型抗体、例えば、キメラ（Chimeric）抗体、ヒト型化（Humanized）抗体などを使用できる。これらの改変抗体は、既知の方法を用いて製造することができる。キメラ抗体は、ヒト以外の哺乳動物、例えば、マウス抗体の重鎖、軽鎖の可変領域とヒト抗体の重鎖、軽鎖の定常領域からなる抗体であり、マウス抗体の可変領域をコードするDNAをヒト抗体の定常領域をコードするDNAと連結し、これを発現ベクターに組み込んで宿主に導入し産生させることにより得ることができる。

【0021】

ヒト型化抗体は、再構成（reshaped）ヒト抗体とも称され、ヒト以外の哺乳動物、たとえばマウス抗体の相補性決定領域（CDR; complementarity determining region）をヒト抗体の相補性決定領域へ移植したものであり、その一般的な遺伝子組換え手法も知られて

いる。具体的には、マウス抗体のCDR とヒト抗体のフレームワーク領域 (framework region; FR) を連結するように設計したDNA 配列を、末端部にオーバーラップする部分を有するように作製した数個のオリゴヌクレオチドからPCR 法により合成する。得られたDNA をヒト抗体定常領域をコードするDNA と連結し、次いで発現ベクターに組み込んで、これを宿主に導入し産生させることにより得られる (欧州特許出願公開番号EP 239400 、国際特許出願公開番号WO 96/02576 参照)。CDR を介して連結されるヒト抗体のFRは、相補性決定領域が良好な抗原結合部位を形成するものが選択される。必要に応じ、再構成ヒト抗体の相補性決定領域が適切な抗原結合部位を形成するように抗体の可変領域のフレームワーク領域のアミノ酸を置換してもよい (Sato, K. et al., Cancer Res. (1993) 53, 851-856)。

【0022】

また、ヒト抗体の取得方法も知られている。例えば、ヒトリンパ球をin vitroで所望の抗原または所望の抗原を発現する細胞で感作し、感作リンパ球をヒトミエローマ細胞、例えばU266と融合させ、抗原への結合活性を有する所望のヒト抗体を得ることもできる (特公平1-59878 参照)。また、ヒト抗体遺伝子の全てのレパートリーを有するトランスジェニック動物を抗原で免疫することで所望のヒト抗体を取得することができる (国際特許出願公開番号WO 93/12227, WO 92/03918, WO 94/02602, WO 94/25585, WO 96/34096, WO 96/33735参照)。さらに、ヒト抗体ライブラリーを用いて、パンニングによりヒト抗体を取得する技術も知られている。例えば、ヒト抗体の可変領域を一本鎖抗体 (scFv) としてファージディスプレイ法によりファージの表面に発現させ、抗原に結合するファージを選択することができる。選択されたファージの遺伝子を解析すれば、抗原に結合するヒト抗体の可変領域をコードするDNA配列を決定することができる。抗原に結合するscFvのDNA配列が明らかになれば、当該配列をを適当な発現ベクターを作製し、ヒト抗体を取得することができる。これらの方法は既に衆知であり、WO 92/01047, WO 92/20791, WO 93/06213, WO 93/11236, WO 93/19172, WO 95/01438, WO 95/15388を参考にすることができる。

【0023】

抗体遺伝子を一旦単離し、適当な宿主に導入して抗体を作製する場合には、適当な宿主と発現ベクターの組み合わせを使用することができる。真核細胞を宿主として使用する場合、動物細胞、植物細胞、真菌細胞を用いることができる。動物細胞としては、(1) 哺乳類細胞、例えば、CHO, COS, ミエローマ、BHK (baby hamster kidney), HeLa, Vero, (2) 両生類細胞、例えば、アフリカツメガエル卵母細胞、あるいは(3) 昆虫細胞、例えば、sf9, sf21, Tn5などが知られている。植物細胞としては、ニコチアナ (Nicotiana) 属、例えばニコチアナ・タバカム (Nicotiana tabacum) 由来の細胞が知られており、これをカルス培養すればよい。真菌細胞としては、酵母、例えば、サッカロミセス (Saccharomyces) 属、例えばサッカロミセス・セレビシエ (Saccharomyces cerevisiae)、糸状菌、例えば、アスペルギルス (Aspergillus) 属、例えばアスペルギルス・ニガー (Aspergillus niger) などが知られている。原核細胞を使用する場合、細菌細胞を用いる産生系がある。細菌細胞としては、大腸菌 (E. coli)、枯草菌が知られている。これらの細胞に、目的とする抗体遺伝子を形質転換により導入し、形質転換された細胞をin vitroで培養することにより抗体が得られる。

【0024】

本発明の安定化製剤に含まれる抗体としては、抗IL-6レセプター抗体、抗HM1.24抗原モノクローナル抗体、抗副甲状腺ホルモン関連ペプチド抗体 (抗PTHrP抗体) などを挙げることができるが、これに限定されない。

【0025】

再構成ヒト型化抗体としては、ヒト型化抗IL-6レセプター抗体 (hPM-1) (国際特許出願公開番号WO 92-19759を参照)、ヒト型化抗HM1.24抗原モノクローナル抗体 (国際特許出願公開番号WO 98-14580を参照)、ヒト型化抗副甲状腺ホルモン関連ペプチド抗体 (抗PTHrP抗体) (国際特許出願公開番号WO 98-13388を参照) などが本発明で使用する好ましい抗体としてあげられる。

【0026】

本発明の溶液製剤に含まれる抗体の免疫グロブリンクラスは何であってもよいが、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4などのIgGが好ましく、IgG1がさらに好ましい。

【0027】

本発明における抗体含有溶液製剤は好ましくは、凍結融解を行った後に、会合体の増加を認めず、不溶性微粒子数が50個/mL以下であることが好ましい。

本発明の抗体含有溶液あるいは溶液製剤では、糖類を添加することにより凍結融解段階の二量体生成を抑制することができる。該糖類としては、スクロース、トレハロース等の非還元二糖類、ラフィノース等の非還元三糖類などの非還元オリゴ糖類などを使用できるが、特に、非還元オリゴ糖類が好ましい。非還元オリゴ糖類では、非還元二糖類が好ましく、さらにスクロース、トレハロースが好ましい。

【0028】

また、本発明の抗体含有溶液あるいは溶液製剤では、糖類を添加することにより長期保存時の会合体生成、分解物生成を抑制できる。該糖類としては、マンニトール、ソルビトール等の糖アルコール；スクロース、トレハロース等の非還元二糖類、ラフィノース等の非還元三糖類などの非還元オリゴ糖類などを使用できるが、特に、非還元オリゴ糖類が好ましい。非還元オリゴ糖類では、非還元二糖類が好ましく、さらにスクロース、トレハロースが好ましい。

【0029】

糖の添加量は0.1～500mg/mL、好ましくは10～300mg/mL、より好ましくは25～100mg/mLである。

本発明では、界面活性剤を添加することにより、抗体含有溶液製剤の凍結融解時における不溶性微粒子の生成を極めて顕著に抑制することができる。界面活性剤としては、非イオン界面活性剤、例えばソルビタンモノカプリレート、ソルビタンモノラウレート、ソルビタンモノパルミテート等のソルビタン脂肪酸エステル；グリセリンモノカプリレート、グリセリンモノミリテート、グリセリンモノステアレート等のグリセリン脂肪酸エステル；デカグリセリンモノステアレート、デカグリセリンジステアレート、デカグリセリンモノリノレート等のポリグリセリン脂肪酸エステル；ポリオキシエチレンソルビタンモノラウレート、ポリオキシエチレンソルビタンモノオレエート、ポリオキシエチレンソルビタンモノステアレート、ポリオキシエチレンソルビタンモノパルミテート、ポリオキシエチレンソルビタントリオレエート、ポリオキシエチレンソルビタントリステアレート等のポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステル；ポリオキシエチレンソルビットテトラステアレート、ポリオキシエチレンソルビットテトラオレエート等のポリオキシエチレンソルビット脂肪酸エステル；ポリオキシエチレングリセリンモノステアレート等のポリオキシエチレングリセリン脂肪酸エステル；ポリエチレングリコールジステアレート等のポリエチレングリコール脂肪酸エステル；ポリオキシエチレンラウリルエーテル等のポリオキシエチレンアルキルエーテル；ポリオキシエチレンポリオキシプロピレングリコール、ポリオキシエチレンポリオキシプロピレンプロピルエーテル、ポリオキシエチレンポリオキシプロピレンセチルエーテル等のポリオキシエチレンポリオキシプロピレンアルキルエーテル；ポリオキシエチレンノニルフェニルエーテル等のポリオキシエチレンアルキルフェニルエーテル；ポリオキシエチレンヒマシ油、ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油（ポリオキシエチレン水素ヒマシ油）等のポリオキシエチレン硬化ヒマシ油；ポリオキシエチレンソルビットミツロウ等のポリオキシエチレンミツロウ誘導体；ポリオキシエチレンラノリン等のポリオキシエチレンラノリン誘導体；ポリオキシエチレンステアリン酸アミド等のポリオキシエチレン脂肪酸アミド等のHLB6～18を有するもの；陰イオン界面活性剤、例えばセチル硫酸ナトリウム、ラウリル硫酸ナトリウム、オレイル硫酸ナトリウム等の炭素原子数10～18のアルキル基を有するアルキル硫酸塩；ポリオキシエチレンラウリル硫酸ナトリウム等の、エチレンオキシドの平均付加モル数が2～4でアルキル基の炭素原子数が10～18であるポリオキシエチレンアルキルエーテル硫酸塩；ラウリルスルホ

コハク酸エステルナトリウム等の、アルキル基の炭素原子数が8～18のアルキルスルホコハク酸エステル塩；天然系の界面活性剤、例えばレシチン、グリセロリン脂質；スフィンゴミエリン等のフィンゴリン脂質；炭素原子数12～18の脂肪酸のショ糖脂肪酸エステル等を典型的例として挙げるができる。本発明の製剤には、これらの界面活性剤の1種または2種以上を組み合わせる添加することができる。本発明の溶液製剤で使用する好ましい界面活性剤は、ポリソルベート20、40、60又は80などのポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステルであり、ポリソルベート20及び80が特に好ましい。また、ポロキサマー（プルロニックF-68（登録商標）など）に代表されるポリオキシエチレンポリオキシプロピレングリコールも好ましい。

【0030】

界面活性剤の添加量は使用する界面活性剤の種類により異なるが、ポリソルベート20又はポリソルベート80の場合では、一般には0.001～100mg/mLであり、好ましくは0.003～50mg/mLであり、さらに好ましくは0.005～2mg/mLである。

【0031】

本発明の抗体含有溶液製剤には好ましくは安定化剤としてヒト血清アルブミンや精製ゼラチンなどのタンパク質を実質的に含まない。

本発明の抗体製剤のpHは、好ましくはpH4～8であり、さらに好ましくはpH5～7であり、さらに好ましくはpH6～6.5である。しかしながら、pHは含まれる抗体により異なり、これらに限定されるものではない。

【0032】

本発明の製剤には等張化剤としてさらに、ポリエチレングリコール、デキストラン、マンニトール、ソルビトール、イノシトール、グルコース、フラクトース、ラクトース、キシロース、マンノース、マルトース、スクロース、トレハロース、ラフィノースなどの糖類を用いることができる。

【0033】

本発明の抗体含有溶液製剤には、所望によりさらに希釈剤、溶解補助剤、賦形剤、pH調整剤、無痛化剤、緩衝剤、含硫還元剤、酸化防止剤等を含有してもよい。例えば、含硫還元剤としては、N-アセチルシステイン、N-アセチルホモシステイン、チオクト酸、チオジグリコール、チオエタノールアミン、チオグリセロール、チオソルビトール、チオグリコール酸及びその塩、チオ硫酸ナトリウム、グルタチオン、並びに炭素原子数1～7のチオアルカン酸等のスルフヒドリル基を有するもの等が挙げられる。また、酸化防止剤としては、エリソルビン酸、ジブチルヒドロキシトルエン、ブチルヒドロキシアニソール、 α -トコフェロール、酢酸トコフェロール、L-アスコルビン酸及びその塩、L-アスコルビン酸パルミテート、L-アスコルビン酸ステアレート、亜硫酸水素ナトリウム、亜硫酸ナトリウム、没食子酸トリアミル、没食子酸プロピルあるいはエチレンジアミン四酢酸二ナトリウム（EDTA）、ピロリン酸ナトリウム、メタリン酸ナトリウム等のキレート剤が挙げられる。さらには、塩化ナトリウム、塩化カリウム、塩化カルシウム、リン酸ナトリウム、リン酸カリウム、炭酸水素ナトリウムなどの無機塩；クエン酸ナトリウム、クエン酸カリウム、酢酸ナトリウムなどの有機塩などの通常添加される成分を含んでいてよい。

【0034】

本発明の製剤は、これらの成分をリン酸緩衝液（好ましくはリン酸一水素ナトリウム－リン酸二水素ナトリウム系）及び／又はクエン酸緩衝液（好ましくはクエン酸ナトリウムの緩衝液）及び／又は酢酸緩衝液などの溶液製剤の分野で公知の水性緩衝液に溶解することによって溶液製剤を調製する。緩衝液の濃度は一般には1～500mMであり、好ましくは5～100mMであり、さらに好ましくは10～20mMである。

【0035】

本発明の抗体含有溶液製剤は通常非経口投与経路で、例えば注射剤（皮下注、静注、筋注、腹腔内注など）、経皮、経粘膜、経鼻、経肺などで投与されるが、経口投与も可能で

ある。

【0036】

本発明の抗体含有溶液製剤は、通常密封、滅菌されたプラスチック又はガラス製のバイアル、アンプル、注射器のような規定容量の形状の容器、ならびに瓶のような大容量の形状の容器で供給することができる。使用の便宜性の点からはプレフィルドシリンジが好ましい。

【0037】

本発明の製剤中に含まれる抗体の量は、治療すべき疾患の種類、疾患の重症度、患者の年齢などに応じて決定できるが、一般には0.1～200mg/mL、好ましくは1～120mg/mLである。更に好ましくは2～22.5mg/mLである。

【0038】

本発明の溶液製剤は、後述の実施例に示すように、界面活性剤を添加することによって不溶性微粒子の生成、特に凍結融解での不溶性微粒子生成を顕著に抑制することができ、さらに長期安定性試験で不溶性異物の発生を顕著に抑制した。また、糖を添加することによって二量体などの会合体の生成と分解物の生成を顕著に抑制し、抗体モノマーの残存率を上昇させることが確認された。

【0039】

本発明を以下の実施例によってさらに詳しく説明するが、本発明の範囲はこれに限定されない。本発明の記載に基づき種々の変更、修飾が当業者には可能であり、これらの変更、修飾も本発明に含まれる。

【実施例】

【0040】

抗体試料

抗IL-6レセプターヒト型化抗体としてhPM-1抗体を使用した。hPM-1抗体は国際特許出願公開番号WO92/19759号公報の実施例10に記載されたヒトエロンゲーシオンファクターI α プロモーターを利用し、特開平8-99902号公報の参考例2に記載された方法に準じて作成したhPM-1ヒト型化抗体である。

【0041】

ヒト型化抗HM1.24抗原モノクローナル抗体として、国際特許出願公開番号WO98-35698の参考例2. の記載された方法に準じて作製した抗体(以下、抗HM1.24抗体という)を用いた。

【0042】

本実施例で用いたhPM-1抗体及び抗HM1.24抗体はいずれもIgG1クラスの抗体である。

試験方法

(A) hPM-1抗体に関する試験

(1) ゲル濾過クロマトグラフィー (GPC)

1mL中にhPM-1約1mg相当量を含むように試料を移動相で希釈し、30～60 μ Lにつき、以下のHPLC条件で試験を行う。

【0043】

カラム：TSK gel G3000SWXL (TOSOH)

ガードカラム：TSK guard column SWXL (TOSOH)

カラム温度：25℃付近の一定温度

移動相：50mMリン酸緩衝液 (pH7.0) - 300mM塩化ナトリウム

流速：約1.0mL/min

測定波長：280nm

ピーク面積を自動積分法により測定し、hPM-1含量をhPM-1標準品ピーク面積より算出し、Initial評価結果よりhPM-1残存率を以下の式を用いて算出した。

【0044】

【数1】

$$\text{hPM-1 含量 (mg/mL)} = \frac{\text{hPM-1 標準品濃度} \times \text{評価 Sample のピーク面積}}{\text{hPM-1 標準品のピーク面積}}$$

$$\text{hPM-1 残存率(\%)} = \frac{\text{熱加速及び凍結融解処理後の hPM-1 含量}}{\text{Initial の hPM-1 含量}} \times 100$$

【0045】

また、面積百分率法により、二量体、その他の会合体及び分解物を以下の式を用いて算出した。

【0046】

【数2】

$$\text{二量体 (その他の会合体、分解物の場合も同様) (\%)} = \frac{\text{二量体 (その他の会合体、分解物) のピーク面積}}{\text{全ピーク面積}} \times 100$$

【0047】

(2) 光遮へい型自動微粒子測定装置 (HIAC) による不溶性微粒子数の評価

日局・一般試験法・注射剤の不溶性微粒子試験法・光遮へい型自動微粒子測定装置による方法に準じる。

(3) 検査機による目視検査

日局・一般試験法・注射剤の不溶性異物検査法に準じ、検査機による目視検査を実施した。

【0048】

目視検査機：型式E422 (エーザイ)

(B) 抗HM1、24抗体に関する試験

(1) ゲル滲過クロマトグラフィー (GPC) ; N=3で測定し、含量についてはInitial品に対する残存率(%)を指標とし、会合体及び分解物はパーセント表示を行った。

【0049】

カラム：TSK gel G3000SWXL (TOSO)

ガードカラム：TSK guard column SWXL (TOSO)

カラム温度：25℃付近の一定温度

移動相：50mMリン酸緩衝液 (pH7.0) - 300mM塩化ナトリウム

流速：約0.5mL/min

測定波長：280nm

濃度算出方法

【0050】

【数3】

$$\text{抗HM1. 24抗体濃度 (mg/mL)} = \frac{\text{標準品濃度} \times \text{抗HM1. 24抗体ピーク面積} \times \text{標準品 注入量}}{\text{標準品ピーク面積合計} \times \text{被験物質 注入量}}$$

$$\text{抗HM1. 24抗体残存率 (\%)} = \frac{\text{熱加速後の抗HM1. 24抗体含量}}{\text{Initial の抗HM1. 24抗体含量}} \times 100$$

【0051】

また、面積百分率法により、会合体及び分解物を算出した。

【0052】

【数4】

$$\text{会合体(分解物の場合も同様)(\%)} = \frac{\text{会合体 (分解物) のピーク面積}}{\text{全ピーク面積}} \times 100$$

【0053】

実施例1：界面活性剤の添加効果（1）

界面活性剤（ポリソルベート80）が熱安定性及び凍結融解に及ぼす影響を試験した。表1に示す種々の濃度のポリソルベート80を含む試料を調製して以下の試験を行った。

（1）熱加速（50℃-2W）における安定性を、ゲル滲過クロマトグラフ（GPC）により測定し、hPM-1残存率、会合体及び分解物の生成量を評価した。また、光遮へい型自動微粒子測定装置（HIAC）により測定し、1mLあたりの不溶性微粒子数を評価した。

（2）凍結融解（-20℃で3日保存後、5℃で1日、このサイクルを3回繰り返す）における安定性を、ゲル滲過クロマトグラフ（GPC）により測定し、hPM-1残存率、会合体及び分解物の生成量を評価した。また、光遮へい型自動微粒子測定装置（HIAC）により測定し、1mLあたりの不溶性微粒子数を評価した。

【0054】

得られた結果を表1に示す。

【0055】

【表1】

＜評価試料及び結果＞

		試料 1	試料 2	試料 3	試料 4
hPM-1 (mg/mL)		20	20	20	20
Polysorbate 80 (mg/mL)		0	0.25	0.5	0.75
Sodium Phosphate (mM)		15	15	15	15
pH		6.5	6.5	6.5	6.5
Initial	hPM-1 含量 (mg/mL)	20.1	20.3	20.3	20.4
	二量体 (%)	0.21	0.22	0.22	0.23
	その他の会合体 (%)	0	0	0	0
	分解物 (%)	0	0	0	0
	微粒子数 10 μ m 以上 (個/mL)	0	0	2	0
	微粒子数 25 μ m 以上 (個/mL)	0	0	0	0
熱加速 (50℃- 2W)	hPM-1 残存率 (%)	99.4	98.2	98.1	98.0
	二量体 (%)	1.38	1.39	1.39	1.41
	その他の会合体 (%)	0	0	0	0
	分解物 (%)	0.91	0.91	0.90	0.90
	微粒子数 10 μ m 以上 (個/mL)	0	0	0	0
	微粒子数 25 μ m 以上 (個/mL)	0	0	0	0
凍 結 融 解 (-20 ℃ → 5 ℃, 3 回)	hPM-1 残存率 (%)	99.7	99.6	99.4	99.3
	二量体 (%)	0.60	0.56	0.52	0.49
	その他の会合体 (%)	0	0	0	0
	分解物 (%)	0	0	0	0
	微粒子数 10 μ m 以上 (個/mL)	3287	7	1	4
	微粒子数 25 μ m 以上 (個/mL)	539	3	0	0

【0056】

ポリソルベート80添加により、凍結融解での不溶性微粒子生成を顕著に抑制することが確認された。また、試験したポリソルベート80の添加濃度による安定性に大きな差は認められなかった。

実施例2：界面活性剤の添加効果（2）

界面活性剤（ポリソルベート80）が凍結融解及び振とうに及ぼす影響を試験した。表2に示す種々の濃度のポリソルベート80を含む試料を調製して以下の試験を行った。

【0057】

凍結融解（-20℃で8時間保存後、5℃で8時間、このサイクルを2回繰り返す）における安定性を、光遮へい型自動微粒子測定装置（HIAC）により測定し、1mLあたりの不溶性微粒子数を評価した。また、検査機による目視検査を実施し、不溶性異物の有無を評価した。

【0058】

得られた結果を表2に示す。

【0059】

【表2】

＜評価試料及び結果＞

		試料 5	試料 6	試料 7	試料 8	試料 9	試料 10
HPM-1 (mg/mL)		20	20	20	20	20	20
Polysorbate 80 (mg/mL)		0	0.005	0.05	0.25	0.5	0.75
Sucrose (mg/mL)		50	50	50	50	50	50
Sodium Phosphate (mM)		15	15	15	15	15	15
pH		6.5	6.5	6.5	6.5	6.5	6.5
Initial	微粒子数 10 μ m 以上 (個/mL)	10	0	0	0	0	0
	微粒子数 25 μ m 以上 (個/mL)	2	0	0	0	0	0
	不溶性異物	有	無	無	無	無	無
凍結融解 (-20℃→5℃, 2回)	微粒子数 10 μ m 以上 (個/mL)	7020	8	0	0	0	1
	微粒子数 25 μ m 以上 (個/mL)	601	0	0	0	0	0
	不溶性異物	有	有	無	無	無	無

【0060】

ポリソルベート80添加により、凍結融解での不溶性微粒子及び不溶性異物の生成を顕著に抑制することが確認された。また、不溶性異物生成抑制効果ではポリソルベート80濃度依存性が確認された。

実施例3：糖の添加効果

糖添加が凍結融解に及ぼす影響を試験した。表3に示す種々の糖（スクロース、マンニトール、トレハロース）を含む試料を調製し、凍結融解（-20℃で2時間保存後、5℃で2時間、このサイクルを22回繰り返す）における安定性を、ゲル滲過クロマトグラフ（GPC）により測定し、二量体の生成量を評価した。

【0061】

【表3】

＜評価試料及び結果＞

		試料 11	試料 12	試料 13	試料 14	試料 15
hPM-1 (mg/mL)		20	20	20	20	20
Sucrose (mg/mL)		0	50	0	0	0
Mannitol (mg/mL)		0	0	50	94	0
Trehalose (mg/mL)		0	0	0	0	50
Polysorbate 80 (mg/mL)		0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Sodium Phosphate (mM)		15	15	15	15	15
pH		6.5	6.5	6.5	6.5	6.5
Initial	二量体 (%)	0.42	0.43	0.41	0.38	0.42
凍結融解 (-20℃→5℃, 22回)	二量体 (%)	0.67	0.43	0.89	2.60	0.41

【0062】

スクロースとトレハロースの添加により、二量体生成の抑制効果が認められた。

実施例4：スクロースが熱安定性及び凍結融解に及ぼす影響

スクロースが熱安定性及び凍結融解に及ぼす影響を試験した。表4に示す種々の濃度のスクロースを含む試料を調製して以下の試験を行った。

(1) 熱加速 (50℃-2W) における安定性を、ゲル濾過クロマトグラフ (GPC) により測定し、hPM-1残存率、会合体及び分解物の生成量を評価した。また、光遮へい型自動微粒子測定装置 (HIAC) により測定し、1mLあたりの不溶性微粒子数を評価した。

(2) 凍結融解 (-20℃で3日保存後、5℃で1日、このサイクルを3回繰り返す) における安定性を、ゲル濾過クロマトグラフ (GPC) により測定し、hPM-1残存率、会合体及び分解物の生成量を評価した。また、光遮へい型自動微粒子測定装置 (HIAC) により測定し、1mLあたりの不溶性微粒子数を評価した。

【0063】

得られた結果を表4に示す。

【0064】

【表4】

<評価試料及び結果>

		試料 16	試料 17	試料 18	試料 19
hPM-1 (mg/mL)		20	20	20	20
Sucrose (mg/mL)		0	25	50	100
Polysorbate 80 (mg/mL)		0.5	0.5	0.5	0.5
Sodium Phosphate (mM)		15	15	15	15
pH		6.5	6.5	6.5	6.5
Initial	hPM-1 含量 (mg/mL)	19.2	19.2	19.3	19.3
	二量体 (%)	0.18	0.16	0.15	0.15
	その他の会合体 (%)	0	0	0	0
	分解物 (%)	0	0	0	0
	微粒子数 10 μ m 以上 (個/mL)	0	0	12	0
	微粒子数 25 μ m 以上 (個/mL)	0	0	1	0
熱加速 (50℃-2W)	hPM-1 残存率 (%)	98.2	98.5	97.8	97.8
	二量体 (%)	1.37	1.47	1.36	1.41
	その他の会合体 (%)	0	0	0	0
	分解物 (%)	0.92	0.89	0.89	0.89
	微粒子数 10 μ m 以上 (個/mL)	0	0	0	0
	微粒子数 25 μ m 以上 (個/mL)	0	0	0	0
凍結融解 (-20℃ → 5℃, 3回)	hPM-1 残存率 (%)	100.2	100.8	100.4	100.2
	二量体 (%)	0.36	0.18	0.17	0.15
	その他の会合体 (%)	0	0	0	0
	分解物 (%)	0	0	0	0
	微粒子数 10 μ m 以上 (個/mL)	1	3	5	2
	微粒子数 25 μ m 以上 (個/mL)	1	0	0	0

【0065】

スクロース添加により、凍結融解での二量体生成を顕著に抑制することが確認された。また、試験したスクロースの添加濃度による安定性に差は認められなかった。

実施例 5：抗体濃度の影響

hPM-1濃度が熱安定性に及ぼす影響を試験した。表5に示す種々の濃度のhPM-1を含む試料を調製して以下の試験を行った。

【0066】

熱加速（50℃-2W）における安定性を、ゲル濾過クロマトグラフ（GPC）により測定し、hPM-1残存率、会合体及び分解物の生成量を評価した。また、光遮へい型自動微粒子測定装置（HIAC）により測定し、1mLあたりの不溶性微粒子数を評価した。

【0067】

得られた結果を表5に示す。

【0068】

【表5】

<評価試料及び結果>

		試料 20	試料 21	試料 22
hPM-1 (mg/mL)		17.5	20	22.5
Sucrose (mg/mL)		50	50	50
Polysorbate 80 (mg/mL)		0.5	0.5	0.5
Sodium Phosphate (mM)		15	15	15
pH		6.5	6.5	6.5
Initial	hPM-1 含量 (mg/mL)	17.0	19.3	21.4
	二量体 (%)	0.16	0.16	0.18
	その他の会合体 (%)	0	0	0
	分解物 (%)	0	0	0
	微粒子数 10 μ m 以上 (個/mL)	0	0	0
	微粒子数 25 μ m 以上 (個/mL)	0	0	0
熱加速 (50℃-2W)	hPM-1 残存率 (%)	99.6	100.2	99.8
	二量体 (%)	1.26	1.35	1.45
	その他の会合体 (%)	0	0	0
	分解物 (%)	0.95	0.93	0.99
	微粒子数 10 μ m 以上 (個/mL)	0	3	0
	微粒子数 25 μ m 以上 (個/mL)	0	0	0

【0069】

hPM-1濃度による安定性に差は認められなかった。

実施例 6：リン酸緩衝液濃度の影響

リン酸緩衝液濃度が熱安定性に及ぼす影響を試験した。表5に示す種々の濃度のリン酸緩衝液を含む試料を調製して以下の試験を行った。

【0070】

熱加速（50℃-2W）における安定性を、ゲル濾過クロマトグラフ（GPC）により測定し、hPM-1残存率、会合体及び分解物の生成量を評価した。また、光遮へい型自動微粒子測定

装置 (HIAC) により測定し、1mLあたりの不溶性微粒子数を評価した。

【0071】

得られた結果を表6に示す。

【0072】

【表6】

<評価試料及び結果>

		試料 23	試料 24	試料 25
hPM-1 (mg/mL)		20	20	20
Sucrose (mg/mL)		50	50	50
Polysorbate 80 (mg/mL)		0.5	0.5	0.5
Sodium Phosphate (mM)		10	15	20
pH		6.5	6.5	6.5
Initial	hPM-1 含量 (mg/mL)	19.3	19.4	19.4
	二量体 (%)	0.17	0.18	0.18
	その他の会合体 (%)	0	0	0
	分解物 (%)	0	0	0
	微粒子数 10 μ m 以上 (個/mL)	0	0	0
	微粒子数 25 μ m 以上 (個/mL)	0	0	0
熱加速 (50°C-2W)	hPM-1 残存率 (%)	100.1	99.0	99.2
	二量体 (%)	1.37	1.43	1.45
	その他の会合体 (%)	0	0	0
	分解物 (%)	0.94	0.95	0.94
	微粒子数 10 μ m 以上 (個/mL)	0	0	0
	微粒子数 25 μ m 以上 (個/mL)	0	0	0

【0073】

リン酸緩衝液濃度による安定性に差は認められなかった。

実施例7：糖の添加効果

抗HM1、24抗体濃度2.5~10mg/mLの範囲での糖（スクロース又はマンニトール）添加効果を確認するため熱安定性試験を実施した。低濃度、高濃度の抗HM1、24抗体製剤に種々の濃度の糖を添加した試料（1mL充填/5mLバイアル）を調製し、種々の保存条件（60°C-1W、50°C-3M、5°C-6M、Initial）における残存率（%）、会合体（%）、分解物（%）を求めた。

【0074】

低濃度製剤の検討処方及び結果を表7と表8に、高濃度製剤の検討処方及び結果を表9と表10に示す。

【0075】

【表7】

	試料 26	試料 27	試料 28	試料 29	試料 30	試料 31	試料 32
抗HM1.24 抗体 (mg/mL)	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5
Sucrose (mg/mL)	10	50	100	—	—	—	—
Mannitol (mg/mL)	—	—	—	10	50	100	—
NaCl (mM)	100	100	100	100	100	100	100
pH	6.0	6.0	6.0	6.0	6.0	6.0	6.0

【0076】

【表8】

60°C-1W	残存率(%)	会合体(%)	分解物(%)
試料 26	90.9%	5.06%	1.99%
試料 27	91.1%	4.60%	1.98%
試料 28	90.0%	4.14%	2.05%
試料 29	85.5%	5.04%	2.20%
試料 30	90.3%	4.99%	1.99%
試料 31	86.6%	5.57%	2.63%
試料 32	88.9%	5.39%	2.09%

50°C-3M	残存率(%)	会合体(%)	分解物(%)
試料 26	77.0%	14.0%	6.98%
試料 27	81.5%	13.7%	6.46%
試料 28	84.9%	12.9%	4.83%
試料 29	78.9%	14.3%	7.31%
試料 30	75.2%	13.2%	6.72%
試料 31	76.1%	12.7%	6.24%
試料 32	76.8%	15.5%	7.62%

5°C-6M	残存率(%)	会合体(%)	分解物(%)
試料 26	103.8%	3.82%	0.00%
試料 27	104.0%	3.44%	0.00%
試料 28	104.2%	3.43%	0.00%
試料 29	103.8%	3.49%	0.00%
試料 30	104.3%	3.46%	0.00%
試料 31	104.3%	3.45%	0.00%
試料 32	103.5%	3.49%	0.00%

Initial	残存率(%)	会合体(%)	分解物(%)
試料 26	100.0%	3.73%	0.00%
試料 27	100.0%	3.34%	0.00%
試料 28	100.0%	3.34%	0.00%
試料 29	100.0%	3.38%	0.00%
試料 30	100.0%	3.36%	0.00%
試料 31	100.0%	3.36%	0.00%
試料 32	100.0%	3.38%	0.00%

【0077】

50°C-3M熱加速品ではスクロースの添加濃度に依存して抗体モノマー残存率の上昇、及び会合体生成量、分解物生成量の低下が確認された。また、60°C-1W加速品においても会合体生成量の低下が確認された。また、50°C-3Mにおける糖の添加効果では、抗体の残存率においてマンニトールよりもスクロースで顕著に添加効果が確認された。なお、会合化抑制の観点では、マンニトールにおいても添加効果が確認されている。

【0078】

【表9】

	試料 33	試料 34	試料 35	試料 36	試料 37	試料 38
抗HM1. 24抗体(mg/mL)	2.5	5.0	5.0	10	10	10
Polysorbate80 (%)	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025
Acetate (mM)	20	20	20	20	20	20
NaCl (mM)	100	100	100	100	100	100
pH	6.0	6.0	6.0	6.0	6.0	6.0
Sucrose (mg/mL)	10	10	20	10	40	0

【0079】

【表10】

60℃-1W	残存率(%)	会合体(%)	分解物(%)
試料 33	96.6%	4.78%	2.16%
試料 34	96.1%	6.47%	1.84%
試料 35	96.1%	6.33%	1.84%
試料 36	96.1%	6.66%	1.76%
試料 37	97.0%	5.96%	1.75%
試料 38	95.3%	7.11%	1.82%

50℃-1M	残存率(%)	会合体(%)	分解物(%)
試料 33	94.6%	5.01%	2.12%
試料 34	95.9%	5.62%	2.06%
試料 35	95.9%	5.27%	2.09%
試料 36	96.7%	5.37%	1.97%
試料 37	97.1%	4.95%	1.96%
試料 38	95.5%	5.69%	2.02%

5℃-6M	残存率(%)	会合体(%)	分解物(%)
試料 33	107.8%	3.50%	0.0%
試料 34	106.1%	3.52%	0.0%
試料 35	106.1%	3.51%	0.0%
試料 36	104.0%	3.59%	0.0%
試料 37	104.1%	3.57%	0.0%
試料 38	103.7%	3.61%	0.0%

Initial	残存率(%)	会合体(%)	分解物(%)
試料 33	100.0%	3.40%	0.0%
試料 34	100.0%	3.36%	0.0%
試料 35	100.0%	3.36%	0.0%
試料 36	100.0%	3.38%	0.0%
試料 37	100.0%	3.37%	0.0%
試料 38	100.0%	3.39%	0.0%

【0080】

熱加速品の会合体生成量を比較すると、抗HM1. 24抗体が同濃度の時、スクロースの添加濃度が多いほど、会合化が抑制されることが示された。抗HM1. 24抗体高濃度製剤においても会合化の抑制にスクロースが寄与していることが確認された。

実施例8：糖添加効果

スクロースの添加効果をさらに種々の添加量で試験した。表11に示す試料を調製し、50℃-1Mで保存した後、GPCで抗体モノマー残存率、会合体量を測定した。得られた結果を表12に示す。

【0081】

【表11】

	試料 39	試料 40	試料 41	試料 42
抗HM1．24抗体 (mg/mL)	10	10	10	10
Polysorbate80 (%)	0.05	0.05	0.05	0.05
Acetate (mmol/L)	10	10	10	10
NaCl (mmol/L)	100	100	100	100
pH	6.0	6.0	6.0	6.0
Sucrose (mg/mL)	0	25	50	75

【0082】

【表12】

	残存率		会合体量	
	Initial	50°C-1M	Initial	50°C-1M
試料 39	100.0%	83.3%	3.6%	12.2%
試料 40	100.0%	86.4%	3.6%	9.7%
試料 41	100.0%	87.8%	3.5%	8.4%
試料 42	100.0%	87.2%	3.5%	8.9%

【0083】

スクロースは抗HM1．24抗体の会合体生成抑制の観点より、添加効果を有することを確認した。

実施例9：糖類の添加効果（凍結融解試験）

糖類（非還元二糖類、非還元三糖類）の添加が凍結融解時及ぼす影響を試験した。表13に示す糖類を含む試料を調製して、以下に示す条件で凍結融解試験を実施した。

【0084】

凍結融解における安定性を二量体（会合体）生成の観点よりゲルろ過クロマトグラフィ（GPC）にて評価した。

【0085】

【数5】

<試験条件>

融解時間：5℃→-20℃（1時間）

保持時間：5℃（6時間）

凍結時間：-20℃→5℃（1時間）

：-20℃（16時間）

【0086】

上記温度変化を3,7及び21回繰り返した。

【0087】

【表13】

表 1 3

<評価試料及び結果>

		試料 43	試料 44	試料 45	試料 46
hPM-1 (mg/mL)		20	20	20	20
Polysorbate 80 (mg/mL)		0.5	0.5	0.5	0.5
Sodium Phosphate (mM)		15	15	15	15
PH		6.5	6.5	6.5	6.5
添加剤 (mM)		—	Sucrose 145	Treharose 145	Raffinose 145
Initial	二量体 (%)	0.4	0.4	0.4	0.4
	その他の会合体 (%)	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
	総会合体量 (%)	0.4	0.4	0.4	0.4
凍結融解 3 回	二量体 (%)	0.7	0.4	0.5	0.8
	その他の会合体 (%)	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
	総会合体量 (%)	0.7	0.4	0.5	0.8
凍結融解 7 回	二量体 (%)	0.8	0.5	0.4	1.0
	その他の会合体 (%)	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
	総会合体量 (%)	0.8	0.5	0.4	1.0
凍結融解 21 回	二量体 (%)	1.0	0.4	0.5	1.3
	その他の会合体 (%)	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
	総会合体量 (%)	1.0	0.4	0.5	1.3

【0088】

以上の結果より、非還元二糖類（スクロース、トレハロース）添加することで、凍結融解時のhPM-1抗体の二量体生成を顕著に抑制することが明らかとなった。

実施例 10：糖類の添加効果（熱苛酷試験）

糖類（非還元二糖類、非還元三糖類）の添加が熱負荷時に及ぼす影響を試験した。表 14、表 15 に示す糖類を含む試料を調製して、以下に示す条件で熱苛酷試験を実施した。

【0089】

熱負荷時における安定性を二量体、会合体生成の観点よりゲルろ過クロマトグラフィ（GPC）にて評価した。

【0090】

【表14】

表 1 4

＜評価試料及び結果＞

		試料 47	試料 48	試料 49	試料 50
hPM-1 (mg/mL)		20	20	20	20
Polysorbate 80 (mg/mL)		0.5	0.5	0.5	0.5
Sodium Phosphate (mM)		15	15	15	15
PH		6.5	6.5	6.5	6.5
添加剤 (mM)		—	Sucrose 145	Treharose 145	Raffinose 145
Initial	二量体 (%)	0.4	0.4	0.4	0.4
	その他の会合体 (%)	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
	総会合体量 (%)	0.4	0.4	0.4	0.4
熱過酷試験 60℃・14 日	二量体 (%)	5.2	6.0	5.6	6.9
	その他の会合体 (%)	6.1	4.5	4.5	4.7
	総会合体量 (%)	11.2	10.5	10.0	11.7

【0091】

本結果より、hPM-1抗体における総会合体量、その他会合体の生成は、非還元二糖類（スクロース、トレハロース）の添加により顕著に抑制されることが明らかとなった。

【0092】

【表15】

表 1 5

		試料 51	試料 52	試料 53	試料 54
抗 HM1.24 抗体 (mg/mL)		10	10	10	10
Polysorbate 80 (mg/mL)		0.25	0.25	0.25	0.25
Acetate (mM)		30	30	30	30
PH		6.0	6.0	6.0	6.0
添加剤 (mM)		—	Sucrose 145	Treharose 145	Raffinose 145
Initial	二量体 (%)	2.8	2.8	2.8	2.8
	その他の会合体 (%)	0.5	0.5	0.5	0.5
	総会合体量 (%)	3.3	3.3	3.3	3.3
熱過酷試験 60℃・14 日	二量体 (%)	9.2	10.4	9.5	9.9
	その他の会合体 (%)	5.6	2.9	4.1	4.3
	総会合体量 (%)	14.8	13.3	13.6	14.2

【0093】

hPM-1抗体同様、抗HM1.24抗体においても、総会合体量、その他会合体の生成は、非還元二糖類（スクロース、トレハロース）の添加により顕著に抑制されることが明らかとなった。

実施例 1 1 : 糖の添加効果 (光加速試験)

糖類 (非還元二糖類、非還元三糖類) の添加が熱負荷時に及ぼす影響を試験した。表 1 6、表 1 7 に示す糖類を含む試料を調製して、以下に示す条件で光加速試験を実施した。

【0094】

光加速時における安定性を二量体、会合体生成の観点よりゲルろ過クロマトグラフィ (GPC) にて評価した。

【0095】

【表16】

<評価試料及び結果>

		試料 55	試料 56	試料 57	試料 58
hPM-1 (mg/mL)		20	20	20	20
Polysorbate 80 (mg/mL)		0.5	0.5	0.5	0.5
Sodium Phosphate (mM)		15	15	15	15
PH		6.5	6.5	6.5	6.5
添加剤 (mM)		—	Sucrose 145	Treharose 145	Raffinose 145
Initial	二量体 (%)	0.4	0.4	0.4	0.4
	その他の会合体 (%)	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
	総会合体量 (%)	0.4	0.4	0.4	0.4
光加速試験 120 万 Lux・hr	二量体 (%)	3.5	2.5	3.2	3.5
	その他の会合体 (%)	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
	総会合体量 (%)	3.5	2.5	3.2	3.5

【0096】

hPM-1抗体において、光照射による二量体生成はスクロース添加により、顕著に抑制できることが明らかとなった。

【0097】

【表17】

表 1 7

		試料 59	試料 60	試料 61	試料 62
抗 HM1.24 抗体 (mg/mL)		10	10	10	10
Polysorbate 80 (mg/mL)		0.25	0.25	0.25	0.25
Acetate (mM)		30	30	30	30
PH		6.0	6.0	6.0	6.0
添加剤 (mM)		—	Sucrose 145	Treharose 145	Raffinose 145
Initial	二量体 (%)	2.8	2.8	2.8	2.8
	その他の会合体 (%)	0.5	0.5	0.5	0.5
	総会合体量 (%)	3.3	3.3	3.3	3.3
光加速試験 120 万 Lux・hr	二量体 (%)	3.8	4.1	3.4	3.1
	その他の会合体 (%)	2.8	0.8	2.8	2.9
	総会合体量 (%)	6.6	4.9	6.2	6.0

【0098】

抗 HM1.24 抗体の光照射による会合体生成はスクロース添加により、顕著に抑制できることが明らかとなった。

実施例 1 2：界面活性剤種の添加効果

界面活性剤種が凍結融解に及ぼす影響を試験した。表 1 8 に示す界面活性剤を含む試料を調製して以下の試験を行った。

【0099】

凍結融解 (−25℃凍結／4℃融解、このサイクルを3回繰り返す) における安定性を、光遮へい型自動微粒子測定装置 (HIAC) により測定し、1mLあたりの微粒子数を評価した。

【0100】

【表18】

表 1 8

<評価試料及び結果>

		試料63	試料64	試料65	試料66	試料67	試料68	試料69	試料70	試料71	試料72	試料73	試料74
HPM-1 (mg/mL)		4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
NaCl (mM)		250	250	250	250	250	250	250	250	250	250	250	250
Sodium Phosphate (mM)		20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20
pH		7.0	7.0	7.0	7.0	7.0	7.0	7.0	7.0	7.0	7.0	7.0	7.0
Polysorbate80 (mg/mL)		0	0.005	0.01	0.05	0.1	0	0	0	0	0	0	0
Polysorbate20 (mg/mL)		0	0	0	0	0	0.01	0.05	0.1	0	0	0	0
Poloxamer188 (mg/mL)		0	0	0	0	0	0	0	0	0.1	0.5	1	2
凍結融解 (-25℃→4℃, 3回)	微粒子数10μm以上 (個/mL)	290	49	22	9	9	14	15	8	7	6	4	5
	微粒子数25μm以上 (個/mL)	13	0	1	1	0	2	3	3	2	2	0	2

【0101】

界面活性剤種（ポリソルベート80，ポリソルベート20，ポロキサマー188）添加により、凍結融解での不溶性微粒子の生成を顕著に抑制することが確認された。

(51)Int.Cl.⁷

F I

テーマコード (参考)

A 6 1 K 47/26

(72)発明者 角田 正也

静岡県御殿場市駒門1丁目135番地 中外製薬株式会社内

(72)発明者 菊池 淳

東京都豊島区高田3丁目41番8号 中外製薬株式会社内

(72)発明者 水嶋 秀文

東京都豊島区高田3丁目41番8号 中外製薬株式会社内

(72)発明者 今枝 好美

東京都豊島区高田3丁目41番8号 中外製薬株式会社内

Fターム(参考) 4C076 AA12 BB01 BB11 BB21 BB25 BB27 BB31 CC07 DD08Q DD09Q

DD26Z DD38Q DD66Q FF11 FF36 FF66 GG45

4C085 AA13 AA14 AA16 BB17 BB36 CC02 CC22 CC23 DD13 DD14

GG01 GG08 GG10